基于 16S rDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析

张　某[1]，杨　璞[2]，朱家颖[3]，袁　远[1]，桂富荣[1]，高　熹[1,*]，吴国星[1,*]

（1. 云南农业大学植物保护学院，昆明 650201；2. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所，国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室，昆明 650224；3. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室，昆明 650224）

摘要：【目的】探究泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* 幼虫肠道细菌的多样性。【方法】利用 Illumina HiSeq 技术对泽兰实蝇幼虫肠道细菌的 16S rDNA-V6 变异区序列进行测序，应用 USEARCH 和 QIIME 等软件整理和统计样品序列数目和操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数量，分析物种的丰度和 Alpha 多样性。【结果】共获得 1 593 506 对 reads，拼接为 1 579 372 条 tags，经过滤后得到的 1 572 860 条 tags 聚类为 1 341 个 OTU。总共注释到 13 个门，4 个纲，6 个目，7 个科，10 个属和 4 个种。其中变形菌门(Proteobacteria)的细菌为优势菌，占 99%；在属分类阶元上，沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 占 45%，是优势属。【结论】泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性丰富。相关的种类和丰度信息为后期研究揭示肠道细菌介导泽兰实蝇寄主植物专化性奠定了基础。

关键词：泽兰实蝇；肠道细菌；多样性；16S rDNA；Illumina

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2016)02-200-09

Analysis of the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis* (Diptera: Trypetidae) based on 16S rDNA gene sequence

ZHANG Mou[1], YANG Pu[2], ZHU Jia-Ying[3], YUAN Yuan[1], GUI Fu-Rong[1], GAO Xi[1,*], WU Guo-Xing[1,*] (1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China; 3. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract:【Aim】To clarify the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis*.【Methods】The V6 regions of the 16S rDNA genes of intestinal bacteria in *P. utilis* larvae was sequenced by Illumina HiSeq techniques. The numbers of sequences and operational taxonomic units (OTUs), species abundance and alpha diversity in samples were analyzed using USEARCH and QIIME softwares.【Results】A total of 1 593 506 reads were obtained, which were combined to 1 579 372 tags. After filtration, 1 572 860 tags were clustered into 1 341 OTUs. They were annotated into 13 phyla, 4 classes, 6 orders, 7 families, 10 genera, and 4 species. The Proteobacteria was the most dominant, accounting for 99%. At the genus level, *Wolbachia* was the dominant bacteria (45%).【Conclusion】The results show that the bacteria in the intestine of larval *P. utilis* are diverse. The information of species richness will lay a foundation for further research on the association of the intestinal bacteria with host plant to reveal feeding specialization in *P. utilis*.

Key words: *Procecidochares utilis*; intestinal bacteria; diversity; 16S rDNA; Illumina

---

基金项目：国家自然科学基金项目(31460491, 31501706)

作者简介：张某，男，1989 年 8 月生，贵州毕节人，硕士研究生，研究方向为有害生物治理，E-mail: zhangmengtao01@outlook.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: chonchon@163.com; wugx1@163.com

收稿日期 Received: 2015-11-07；接受日期 Accepted: 2016-01-08

昆虫肠道栖息着大量的微生物。在长期进化过程中,肠道微生物与昆虫发展出紧密的共生关系,一方面,微生物进化出一系列策略来适应昆虫肠道环境;另一方面,肠道微生物通过提供营养(Morrison *et al*., 2009; Frago *et al*., 2012)、抵抗外来微生物侵袭(Dillon *et al*., 2005)、参与多重营养层关系(Spiteller *et al*., 2000; Robacker *et al*., 2009; Frago *et al*., 2012)、合成信息素成分(Dillon *et al*., 2002)、引起宿主昆虫免疫反应(Dillon and Charnley, 1995)和降解食物中的有毒物质(Robacker and Lauzon, 2002; Chakri *et al*., 2007; 柳丽君等, 2011)等作用,影响着宿主昆虫的生命活动(Behar *et al*., 2008; 相辉和黄勇平, 2008),甚至有些细菌是宿主昆虫生长发育及繁殖所不可缺少的(Dillon and Charnley, 2002; Dillon *et al*., 2002; Brummel *et al*., 2004)。有关昆虫肠道细菌多样性的研究主要集中在等翅目、鳞翅目、同翅目、直翅目、蜚蠊目、膜翅目、半翅目、双翅目和鞘翅目等昆虫中,优势细菌的种类因昆虫种类而异(相辉和黄勇平, 2008)。

泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* Stone 是入侵性多年生恶性杂草——紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* Spreng 的专性寄生天敌,即泽兰实蝇 *P. utilis* 对紫茎泽兰 *E. adenophorum* 的寄生是专一的,不寄生其他植物(Dodd, 1961; 何大愚等, 1987; 陈旭东和何大愚, 1990)。紫茎泽兰中存在对许多昆虫及其他动物有不利影响的植物次生物质(闫乾胜等, 2006),泽兰实蝇幼虫克服这些植物次生物质的策略尤为重要。在野生状态下昆虫所摄取的植物中含有一定杀菌作用的次生代谢物质,会影响肠道菌群的组成,某些具有解毒功能的细菌种类往往被选择而保留下来,并参与宿主的生理代谢(Dillon and Dillon, 2004; 相辉和黄勇平, 2008)。因此,泽兰实蝇幼虫肠道细菌在其克服植物次生物质并专性寄生紫茎泽兰中可能起着重要作用。但是,关于泽兰实蝇肠道细菌的研究还未见报道。为此,本研究采用 16S rDNA 基因文库技术和 Illumina HiSeq 测序技术检测了自然种群泽兰实蝇幼虫肠道内的细菌群落及多样性,为进一步研究肠道细菌介导泽兰实蝇专性寄生紫茎泽兰的机制提供了理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试植物与昆虫

从云南农业大学大棚种植的紫茎泽兰上采集泽兰实蝇虫瘿,室内用刀片剖开虫瘿,选取 3 龄泽兰实蝇幼虫作为供试昆虫。

1.2　肠道的分离及总 DNA 的提取

取泽兰实蝇幼虫,无菌操作条件下解剖出肠道,在解剖之前需要准备 75% 乙醇(用于虫体表面消毒)和 PBS 溶液(Martínez-Falcón *et al*., 2011; Liu *et al*., 2012)(1 000 mL, NaCl 8 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, pH 7.2)并在 PBS 溶液中解剖,之后低速(2 000 r/min)离心 1 min 除去沉淀的昆虫组织,取上清液于 4℃ 15 000 r/min 离心 5 min,沉淀的菌体用于提取 DNA(Latorre *et al*., 1986)。在无菌水中缓慢清洗后放入一个灭菌的 2 mL 离心管中,-20℃条件下保存以便用于 DNA 的提取。用 75% 的乙醇漂洗 3 次,每次 2 min,然后用无菌水清洗 5 次,每次 2 min。使用 DNeasy® Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒(Qiagen, US)提取 DNA,溶于 50 μL ddH_2O 中,使用分光光度计(Eppendorf, German)测定浓度及 OD_{260}/OD_{280} 比值,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量。DNA 样品于 -20℃保存备用。

1.3　PCR 扩增肠道共生菌的 16S rDNA

以上述方法提取总 DNA 作为模板,对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。用引物 967F(5′-CAACGCGAAGAACCTTACC-3′)和 1046R(5′-CGACAGCCATGCANCACCT-3′)组合扩增泽兰实蝇肠道的 16S rDNA 的 V6 变动区。所用 Taq 酶为 Pfu DNA Polymerase(TaKaRa, 日本),反应体系如下: Polymerase 0.25 μL, 10 × buffer(含 Mg^{2+})5 μL, dNTPs(10 mmol/L)1 μL, 上下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 5 μL, ddH_2O 补至 50 μL。PCR 反应程序: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环。

1.4　PCR 产物纯化

将 PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,切起目的条带,使用 High Pure PCR Product Purification Kit(Roche)胶回收试剂盒回收纯化产物,方法参照试剂盒说明书。

1.5　文库建立及高通量测序

回收的扩增目的片段,用 T4 DNA Polymerase, Klenow DNA Polymerase 和 T4 PNK 将打断形成的粘性末端修复成平末端,再通过 3′端加碱基“A”,使得 DNA 片段能与 3′端带有“T”碱基的特殊接头连接,以基因组 DNA 为模板,进行融合引物 PCR,磁珠筛选目的 Amplicon 片段,最后,用合格的文库进行

cluster 制备和 Illumina 测序(Bai *et al*., 2010; Martínez-Falcón *et al*., 2011; Liu *et al*., 2012; Lee *et al*., 2014),采用双末端(paired end)测序。

1.6 序列分析

测序得到的原始数据(raw data)中存在一定比例的污染数据(dirty data),为使信息分析结果更加准确、可靠,首先对原始数据进行拼接、过滤,得到有效数据(clean data)(Edgar *et al*., 2011)。基于有效数据进行 read 拼接,reads 末端拼接通过它们之间的重叠区域间的关系拼接成 Tags(Zerbino and Birney, 2008)。

1.7 肠道微生物系型鉴定和多样性分析

利用软件 USEARCH(v7.0.1090)在 97% 相似度下进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类(Edgar, 2013),利用 QIIME 软件中的 align_seqs.py 程序将 OTU 代表序列进行比对(16S 与 18S 通过 PyNAST 算法与数据库为 Silva_108_core_aligned_seqs 进行比对,ITS 通过 MUSCLE 软件进行比对),得到比对好的 OTU 序列并利用 make_phylogeny.py 程序生成 OTU 的进化树,用于 Beta 多样性分析。通过 OTU 的丰度文件,从比对 OTU 比对文件中挑选出每个属丰度最高的 OTU 的序列作为该属的代表序列,通过 QIIME(v1.80)软件中的 make_phylogeny.py,方法为"fasttree"构建系统进化树。最后通过 R 软件(v3.0.3)将系统进化树图形化 。这将 OTU 和物种注释结合,从而得到样品的 OTUs 和分类谱系的基本分析结果。再对 OTUs 进行丰度、多样性指数等分析,同时对物种注释在各个分类水平上进行群落结构的统计分析(Wang *et al*., 2007)。

2 结果

2.1 序列拼接和组装

泽兰实蝇幼虫肠道细菌的 16S rDNA 基因序列文库共获得 1 593 506 条 reads,拼接后得到 1 579 372条 tags,拼接率为 99.11% ,tag 平均长度为 99 ± 2 bp(带接头)。拼接的 tags 经过优化得到 1 571 860条,在 97% 相似度下可将其聚类为用于物种分类的 1 341 个 OTUs。

2.2 泽兰实蝇幼虫肠道细菌物种及其丰度

基于 OTUs 的分类结果,将样品中物种丰度低于 0.5% 的物种全部合并为 Others。在门分类阶元水平,泽兰实蝇幼虫肠道细菌的 16S rDNA 基因序列文库共注释到了放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、OD1、变形菌门(Proteobacteria)、TM7、柔膜菌门(Tenericutes)、栖热菌门(Thermi)和疣微菌门(Verrucomicrobia)等 13 个门,其中变形菌门的细菌为优势菌,占 99% (图 1: A)。在纲分类阶元水平,共注释了 4 个纲:α-变形菌纲(Alphaproteobacteria)、β-变形菌纲(Betaproteobacteria)、黄杆菌纲(Flavobacteriia)和 γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria),各纲的比例依次为 56% , 18% , 1% 和 25% (图 1: B)。在目分类阶元水平,共注释了 6 个目:交替单胞菌目(Alteromonadales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、黄杆菌目(Flavobacteriales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、立克次体目(Rickettsiales)和鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales),各目的比例依次为 1% , 16% , 1% , 18% , 54% 和 2% (图 1: C)。在科分类阶元水平,共注释了 7 个科着色菌科(Chromatiaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、莫拉菌科(Moraxellaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、立克次体科(Rickettsiaceae)和鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae),各科的比例依次为 1% , 16% , 1% , 10% , 8% , 53% 和 2% (图 1: D)。在属分类阶元水平,共注释了 10 个属:食酸菌属 *Acidovorax*,不动杆菌属 *Acinetobacter*,水杆菌属 *Aquabacterium*,代尔夫特菌属 *Delftia*,黄杆菌属 *Flavobacterium*,假单胞菌属 *Pseudomonas*,伦黑墨氏菌属 *Rheinheimera*,立克次体属 *Rickettsia*,鞘脂菌属 *Sphingobium* 和沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*,各属的比例依次为 6% , 10% , 8% , 1% , 1% , 5% , 1% , 9% , 1% 和 45% ,*Wolbachia* 是优势属,次优势属是 *Acinetobacter*(图 1: E)。在种分类阶元水平,只注释到洛菲不动杆菌 *Acinetobacter lwoffii*,立克次体菌 *Rickettsia endosymbiont*,施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzer* 和矢野口鞘氨醇菌 *Sphingobium yanoikuyae* 共 4 个种,比例依次为 7% , 6% , 2% 和 1% ;另有 83% 的菌不能被注释(图 1: F)。泽兰实蝇幼虫肠道细菌的进化关系如图 2 所示。

2.3 泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析

OTUs Rank 曲线是展现样品中物种多样性的一种形式,可以同时解释样品多样性的两个方面,即样

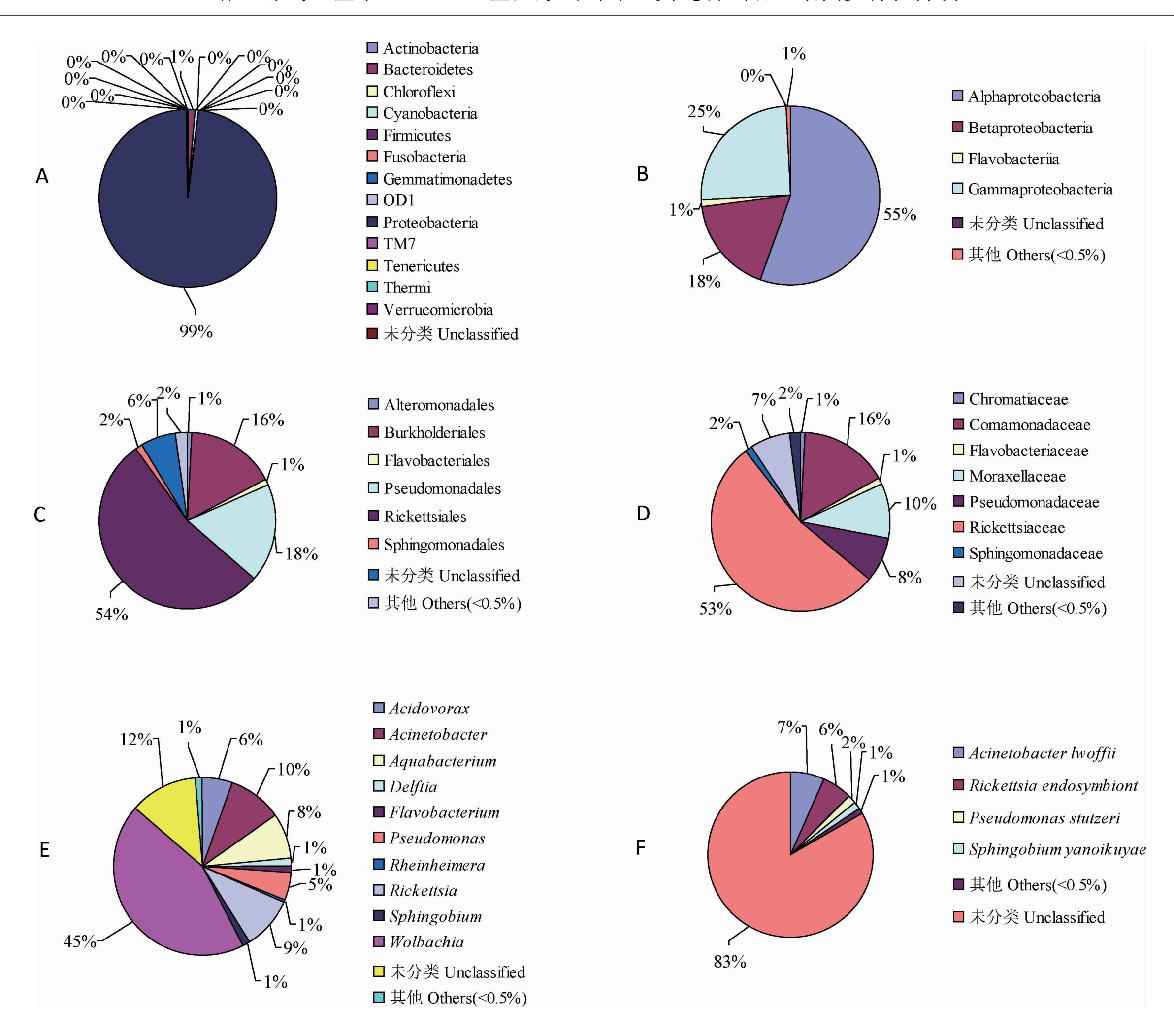


图 1　泽兰实蝇幼虫肠道细菌在不同分类等级上的物种比例

Fig. 1　The proportions of the bacteria species in the intestine of larval *Procecidochares utilis* at different classification levels

A：样品门分类水平中物种比例饼状图 The taxonomic composition distribution in samples of phylum-level；B：样品纲分类水平中物种比例饼状图 The taxonomic composition distribution in samples of class-level；C：样品目分类水平中物种比例饼状图 The taxonomic composition distribution in samples of order-level；D：样品科分类水平中物种比例饼状图 The taxonomic composition distribution in samples of family-level；E：样品属分类水平中物种比例饼状图 The taxonomic composition distribution in samples of genus-level；F：样品种分类水平中物种比例饼状图 The taxonomic composition distribution in samples of species-level.

品所含物种的丰富程度和均匀程度。样品中物种的丰富程度由曲线的横轴长度来反映，曲线越宽，说明样品中物种组成越丰富。样品中物种的均匀度由曲线纵轴的形状来反映，曲线越平坦，说明样品中物种组成的均匀度越高。由图 3 OTUs Rank 曲线图可知，泽兰实蝇幼虫肠道中的细菌组成丰富，均匀度高。

另外，Alpha 多样性（alpha diversity）是对单个样品中物种多样性的分析，Sobs 指数、Chao 指数和 Ace 指数反映样品中群落的丰富度，而 Shannon 指数反映群落的多样性，Simpson 指数反映群落中优势种的集中程度。Sobs 指数、Chao 指数、Ace 指数和 Shannon 指数这 4 个指数越大，Simpson 指数越小，说明样品中的物种越丰富多样。由表 1 可知，泽兰实蝇幼虫肠道中的细菌种类有较高的丰富度和多样性。

表 1　泽兰实蝇幼虫肠道细菌的多样性指数统计

Table 1　Statistics of alpha indices of the bacteria in the intestine of larval *Procecidochares utilis*

Sobs	Chao	Ace	Shannon	Simpson
1 341.0000	1 341.0000	1 341.0000	3.4193	0.0799

3　讨论

本研究采用 16S rDNA 和 Illumina 技术首次开展泽兰实蝇幼虫肠道细菌菌落组成分析，一共注释

图 2 泽兰实蝇幼虫肠道细菌的物种系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the bacteria in the intestine of larval *Procecidochares utilis* at the genus level

相同颜色属名代表相同的门。The genus names of the same phylum are shown with the same color.

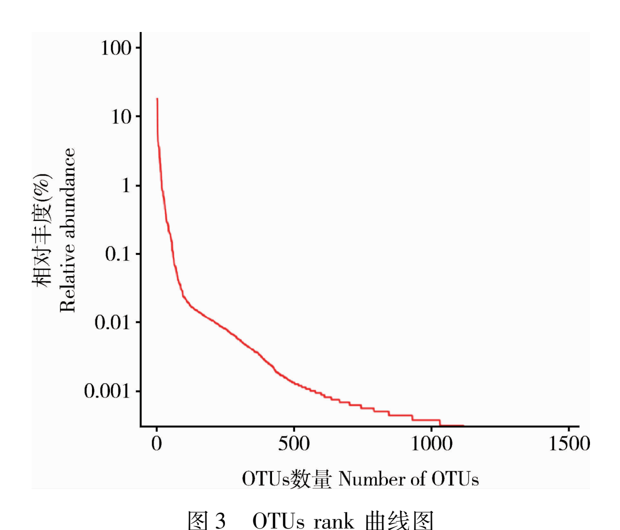


图 3 OTUs rank 曲线图

Fig. 3 OTUs rank curve

横坐标为样品 OTU 丰度排位(由高至低),纵坐标为 OTU 丰度 The horizontal axis stands for the sample OTU abundance rank (from high to low), and the longitudinal axis for the OTU abundance.

鉴定获得 13 个门,4 个纲,6 个目,7 个科,10 个属,4 个种。在鉴定的 13 个门中,以变形菌门的细菌为主(99%),该结果与有些昆虫肠道中的优势菌相同。如,双翅目柑橘大实蝇 *Bactrocera* (*Tetradacus*) *minax*、地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 和沙蝇 *Lutzomyia longipalpis*,直翅目的沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*,半翅目的豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*、黑豆蚜 *Aphis fabae*、点蜂缘椿象 *Riptortus clavatus* 和扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*,鞘翅目天牛 *Saperda vestita*,以及鳞翅目茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 等昆虫肠道中鉴定获得的优势菌均为变形菌门细菌(Dillon and Charnley, 2002; Haynes *et al*., 2003; Schloss *et al*., 2006; Kikuchi *et al*., 2007; Behar *et al*., 2008; Sant'Anna *et al*., 2012; 靳亮等, 2013; Wang *et al*., 2014; 王震杰, 2014)。但是,该结果与有些昆虫肠道中的优势菌则有所不同,如,除变形菌门的细菌外,双翅目果蝇 *Drosophila* 肠道的优势菌还有厚壁菌门的细菌,家蝇 *Musca domestica* 肠道的优势菌则还有厚壁菌门和拟杆菌门的细菌(Gupta *et al*., 2011; Wong *et al*., 2013),而等翅目白蚁肠道的优

势菌还有拟杆菌门、厚壁菌门、螺旋体门的细菌，因白蚁种类而有所差别（Ohkuma *et al.*, 2002；Shinzato *et al.*, 2005, 2007；员超，2014），膜翅目蜜蜂肠道的优势菌还有厚壁菌门的细菌（张义强，2013），鳞翅目昆虫舞毒蛾 *Lymantria dispar*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、家蚕 *Bombyx mori*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和贡嘎蝠蛾 *Hepjalus gonggaensis* 肠道的优势菌主要还有厚壁菌门的细菌（Broderick *et al.*, 2004；Xiang *et al.*, 2006；相辉等，2007；刘莉等，2008；夏晓峰，2014）；鞘翅目昆虫五月鳃金龟 *Melolontha melolontha* 肠道的优势菌属于厚壁菌门（Egert *et al.*, 2005），暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* 肠道的优势菌属于变形菌门和放线菌门（Huang *et al.*, 2012），而光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 肠道中的优势菌则有变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门 4 类细菌（Schloss *et al.*, 2006）。昆虫肠道微生物的多样性除了与昆虫种类有关外，还与食物及环境因素相关（相辉和黄勇平，2008）。因此，尚需要进一步研究来自不同寄主生育期和不同地理种群的泽兰实蝇幼虫的肠道微生物多样性，方能更全面地明确泽兰实蝇幼虫肠道细菌的多样性。

在鉴定获得的泽兰实蝇幼虫肠道细菌 10 个属中，沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 为优势属，占 45%，这与已报道的其他实蝇肠道优势细菌属存在很大的差异，如，柑橘大实蝇 *B. minax* 以克雷伯氏菌属 *Klebsiella* 和柠檬酸杆菌属 *Citrobacter* 为肠道细菌优势属（Wang *et al.*, 2014）；地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 肠道细菌优势属有主要有克雷伯氏菌属 *Klebsiella*、泛菌属 *Pantoea*、肠杆菌属 *Enterobacter*、果胶杆菌属 *Pectobacterium* 和柠檬酸杆菌属 *Citrobacter*（Behar *et al.*, 2008）。这些差异的肠道细菌的功能值得关注，我们期待能在其中发掘出与泽兰实蝇专性寄生或解毒紫茎泽兰毒性次生物质相关的肠道细菌或特定基因。

在泽兰实蝇幼虫肠道细菌中的优势菌沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物体内的一类共生细菌，其除了能够以诱导细胞质不亲和、诱导孤雌生殖、雌性化和杀雄作用等多种方式调控寄主的生殖行为外，还能为宿主带来更好的适合度（fitness）。首先，*Wolbachia* 参与宿主的营养代谢。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、缩基反颚茧蜂 *Asobara tabida*、拟果蝇 *D. simulans* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中，*Wolbachia* 参与了宿主的铁营养代谢过程（Brownlie *et al.*, 2009；Kremer *et al.*, 2009）。在蓿类臭虫 *Cimex lectularius* 中，*Wolbachia* 能帮助宿主合成维生素 B（Nikoh *et al.*, 2014）。其次，它能增强宿主的抗逆性。如 *Wolbachia* 能增加黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 对 RNA 病毒的抗性（Hedges *et al.*, 2008；Teixeira *et al.*, 2008；Glaser and Meola, 2010）；能增强尖音库蚊 *Culex pipiens* 对杀虫剂的抗性（Berticat *et al.*, 2002）；能通过调控寄主植物的生理来帮助斑幕潜叶蛾 *Phyllonorycter blancardella* 在衰老的寄主植物上正常生长发育（Kaiser *et al.*, 2010）。此外，它还提高宿主的嗅觉反应能力，如 *Wolbachia* 感染能够显著提高拟果蝇的嗅觉反应能力（彭宇和王玉凤，2009）。泽兰实蝇肠道内 *Wolbachia* 的存在，是否有益于泽兰实蝇的营养代谢，增强其抗逆性，或是提高其搜寻寄主的能力，这有待后续实验的进一步验证。

除沃尔巴克氏菌外，立克次体属 *Rickettsia* 也是广泛分布于节肢动物体内的一类共生细菌。除了通过诱导杀雄、诱导孤雌生殖等影响宿主的生殖行为外，还提高宿主的适合度。如，有研究表明，*Rickettsia* 可以提高烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的产卵量、存活率及后代雌虫的比例，缩短发育历期（Himler *et al.*, 2011）；还可以提高豌豆蚜 *A. pisum* 对高温的忍耐力及其抵御寄生蜂的能力（Montllor *et al.*, 2002；Oliver *et al.*, 2003）。因紫茎泽兰中存在一些不利于昆虫生长发育的物质（闫乾胜等，2006），这些物质的存在可能影响泽兰实蝇的繁殖能力、生长发育以及耐受性，*Rickettsia* 是否在泽兰实蝇繁殖、生长发育或耐受不良环境条件的过程中起着某些重要作用，有待进一步研究。

有些假单胞菌 *Pseudomonas* 对昆虫有害，如荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 能杀死蚊子和家蝇 *M. domestica*（Padmanabhan *et al.*, 2005），铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 是秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、果蝇 *Drosophila* 和黄尾蛾 *Hylesia metabus* 幼虫的致病菌（Osborn *et al.*, 2002；Apidianakis *et al.*, 2005；Hilbi *et al.*, 2007），铜绿假单胞菌也能缩短地中海实蝇 *C. capitata* 的寿命（Behar *et al.*, 2008）。相反，有些假单胞菌 *Pseudomonas* 对昆虫有益，如铜绿假单胞菌能抵抗蚊子体内的寄生虫（Azambuja *et al.*, 2005），一种假单胞菌能在毒隐翅虫 *Paederus fuscipes* 体内产生抗肿瘤的聚酮化合物青腰虫素（pederin）（Piel *et al.*, 2004），一种假单胞菌对昆虫病原真菌（entomopathogenic fungi）有拮抗活性（antagonistic activity）（Indiragandhi *et al.*, 2007）。

因此,假单胞菌对泽兰实蝇的生理功能有待于后续实验的进一步验证。

代尔夫特菌属 *Delftia* 广泛分布于自然界,为人类少见的机会致病菌,能表现出很多重要的代谢特征,包括抑制植物病原菌的生长,高效固氮能力,转换苯胺为 TAC-循环的中间介质,降解多种低分子量的苯类物质,去毒化和对阿司匹林和头孢菌素等超强及广泛的抗性等(牛丽华, 2013)。*Delftia* 的诸多代谢功能有可能是泽兰实蝇解毒紫茎泽兰毒性次生物质的关键,这也将是后续研究的一个切入点。另外,不动杆菌属 *Acinetobacter*、食酸菌属 *Acidovorax*、水杆菌属 *Aquabacterium*、黄杆菌属 *Flavobacterium*、伦黑墨氏菌属 *Rheinheimera* 和鞘脂菌属 *Sphingobium* 则均具有氮素转化的功能(Nalcaci *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2012; 叶正芳等, 2013; 彭方仁等, 2014; Ren *et al*., 2014; 王泽等, 2015)。倘若这些肠道细菌转化的氮被紫茎泽兰利用,将有利于紫茎泽兰的生长。这也许是泽兰实蝇幼虫取食紫茎泽兰时在取食部位形成虫瘿的原因之一,这有待于后续实验的进一步验证。

参考文献(References)

Apidianakis Y, Mindrinos MN, Xiao WZ, Lau GW, Baldini RL, Davis RW, Rahme LG, 2005. Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(7): 2573-2578.

Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA, 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol*., 21(12): 568-572.

Bai XD, Zhang W, Orantes L, Jun TH, Mittapalli O, Mian MAR, Michel AP, 2010. Combining next-generation sequencing strategies for rapid molecular resource development from an invasive aphid species, *Aphis glycines*. *PLoS ONE*, 5(6): e11370.

Behar A, Yuval B, Jurkevitch E, 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *J. Insect Physiol*., 54(9): 1377-1383.

Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M, 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc. Biol. Sci*., 269(1498): 1413-1416.

Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol*., 70(1): 293-300.

Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL, 2009. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog*., 5(4): e1000368

Chakri M, Haidani AE, Mzibri ME, Haggoud A, Iraqui M, Houari A, Koraichi SI, 2007. Yeast strains from the endogenous microflora of the olive flies *Bactrocera oleae* larvae which could degrade the olive oil mill wastewaters polyphenols. *Ann. Microbiol*., 57(2): 143-147.

Chen XD, He DY, 1990. Study on control effect of *Procecidochares utilis* on *Eupatorium adenophorum* and its evaluation. *Journal of Weed Science*, 4(3): 1-6. [陈旭东, 何大愚, 1990. 泽兰实蝇对紫茎泽兰的控制作用及其评价研究. 杂草学报, 4(3): 1-6]

Dillon R, Charnley K, 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol*., 153(8): 503-509.

Dillon RJ, Dillon VM, 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol*., 49: 71-92.

Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett*., 8(12): 1291-1298.

Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK, 2002. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol*., 92(4): 759-763.

Dodd AP, 1961. Biologocal control of *Eupatorium adenophorum* in Queensland. *Aust. J. Sci*., 23(11): 356-365.

Edgar RC, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods*, 10(10): 996-998.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 13(4): 358-367.

Egert M, Stingl U, Bruun DL, Pommerenke B, Brune A, Friedrich MW, 2005. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol*., 71(8): 4556-4566.

Frago E, Dicke M, Godfray HCJ, 2012. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends Ecol. Evol*., 27(12): 705-711.

Glaser RL, Meola MA, 2010. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS ONE*, 5(8): e11977.

Gupta AK, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate HV, Patole MS, Shouche YS, 2012. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol. Ecol*., 79(3): 581-593.

Haynes S, Darby AC, Daniel TJ, Webster G, van Veen FJF, Godfray HCJ, Prosser JI, Douglas AE, 2003. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol*., 69(12): 7216-7223.

He DY, Liu LH, Jing GF, Wei Y, 1987. The safety testing of the tephritid gall fly, *Procecidochares utilis* stone. *Chinese Journal of Biological Control*, 3(1): 1-3. [何大愚, 刘伦辉, 荆桂芬, 魏艺, 1987. 泽兰实蝇的安全性试验. 生物防治通报, 3(1): 1-3]

Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN, 2008. *Wolbachia*

and virus protection in insects. *Science*, 322(5902): 702.

Himler AG, Adachi-Hagimori T, Bergen JE, Kozuch A, Kelly SE, Tabashnik BE, Chiel E, Duckworth VE, Dennehy TJ, Zchori-Fein E, Hunter MS, 2011. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science*, 332(6026): 254 – 256.

Huang SW, Sheng P, Zhang HY, 2012, Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int. J. Mol. Sci*., 13(3): 2563 – 2577.

Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kim GH, Saravanan VS, Sa T, 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamond-back moth, *Plutella xylostella* and their potential for antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. *J. Appl. Microbiol*., 103(6): 2664 – 2675.

Jin L, Wang JC, Wang HX, Zhang JG, Yang G, Jin HY, 2013. Bacterial community in midguts of *Ectropic oblique* larvae by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis. *Jiangxi Science*, 31 (6): 759 – 763. [靳亮，王金昌，王洪秀，张贱根，杨罡，靳海燕，2013. 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术分析茶尺蠖幼虫肠道细菌种群结构及多样性. 江西科学，31(6): 759 – 763]

Kaiser W, Huguet E, Casas J, Commin C, Giron D, 2010. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proc. Biol. Sci*., 277(1692): 2311 – 2319.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T, 2007. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol*., 73(13): 4308 – 4316.

Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F, 2009. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*., 5(10): e1000630.

Latorre A, Moya A, Ayala FJ, 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (22): 8649 – 8653.

Lee JK, Lee YY, Park KH, Sim J, Choi Y, Lee SJ, 2014. *Wohlfahrtiimonas larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Anton. Leeuw. Int. J. G*., 105(1): 15 – 21.

Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616 – 622. [刘莉，王中康，俞和韦，陈仕江，阎光凡，夏玉先，殷幼平，2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报，48 (5): 616 – 622]

Liu LJ, Li ZH, Dai Y, 2011. Research progress on the bacterial and fungal symbionts in fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Biosafety*, 20(2): 91 – 99. [柳丽君，李志红，戴阳，2011. 实蝇共生菌研究进展. 生物安全学报，20(2): 91 – 99]

Liu SJ, Chougule NP, Vijayendran D, Bonning BC, 2012. Deep sequencing of the transcriptomes of soybean aphid and associated endosymbionts. *PLoS ONE*, 7(9): e45161.

Martínez-Falcón AP, Durbán A, Latorre A, Antón J, Marcos-García MLÁ, 2011. Bacteria associated with *Copestylum* (Diptera, Syrphidae) larvae and their cactus host *Isolatocereus dumortieri*. *PLoS ONE*, 6(11): e27443.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH, 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol*., 27(2): 189 – 195.

Morrison M, Pope PB, Denman SE, McSweeney CS, 2009. Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new? *Curr. Opin. Biotech*., 20(3): 358 – 363.

Nalcaci OO, Böke N, Ovez B. 2011. Potential of the bacterial strain *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* LMG 17238 and macro algae *Gracilaria verrucosa* for denitrification. *Desalination*, 274: 44 – 53.

Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T, 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(28): 10257 – 10262.

Niu LH, 2013. Bacterial Diversities Associated with the Fig and Four Fig Wasp Species of *Ficus hispida*. PhD Dissertation, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [牛丽华，2013. 对叶榕榕果和四种榕小蜂的细菌多样性. 山东泰安：山东农业大学博士学位论文]

Ohkuma M, Noda S, Hongoh Y, Kudo T, 2002. Diverse bacteria related to the Bacteroides subgroup of the CFB phylum within the gut symbiotic communities of various termites. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 66(1): 78 – 84.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(4): 1803 – 1807.

Osborn F, Berlioz L, Vitelli-Flores J, Monsalve W, Dorta B, Lemoine VR, 2002. Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae). *J. Invertebr. Pathol*., 80(1): 7 – 12.

Padmanabhan V, Prabakaran G, Paily KP, Balaraman K, 2005. Toxicity of a mosquitocidal metabolite of *Pseudomonas fluorescens* on larvae and pupae of the house fly, *Musca domestica*. *Indian J. Med. Res*., 121(2): 116 – 119.

Peng FR, Liang YW, Cai M, Chen LS, Chen YZ, 2014. The 16S rDNA sequences analysis of associative nitrogen fixing bacteria from rhizosphere of *Camellia oleifera*. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 38(1): 27 – 30. [彭方仁，梁有旺，蔡苗，陈隆升，陈永忠，2014. 油茶根际联合固氮菌的 16S rDNA 全序列分析. 南京林业大学学报(自然科学版)，38 (1): 27 – 30]

Peng Y, Wang YF, 2009. Infection of *Wolbachia* may improve the olfactory response of *Drosophila*. *Chinese Science Bulletin*, 54(5): 596 – 602. [彭宇，王玉凤，2009. *Wolbachia* 感染显著提高果蝇的嗅觉反应. 科学通报，54(5): 596 – 602]

Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S, 2004. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(46): 16222 – 16227.

Ren YX, Yang L, Liang X, 2014. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium,

Acinetobacter junii YB. *Bioresource Technol*., 171: 1–9.

Robacker DC, Lauzon CR, Patt J, Margara F, Sacchetti P, 2009. Attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to bacteria: effects of culturing medium on odour volatiles. *J. Appl. Entomol*., 133(3): 155–163.

Robacker DC, Lauzon CR. 2002. Purine metabolizing capability of *Enterobacter agglomerans* affects volatiles production and attractiveness to Mexican fruit fly. *J. Chem. Ecol*., 28(8): 1549–1563.

Sant'Anna MRV, Darby AC, Brazil RP, Montoya-Lerma J, Dillon VM, Bates PA, Dillon RJ, 2012. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS ONE*, 7(8): e42531.

Schloss PD, Delalibera IJr, Handelsman J, Raffa KF, 2006. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environ. Entomol*., 35(3): 625–629.

Shinzato N, Muramatsu M, Matsui T, Watanabe Y, 2005. Molecular phylogenetic diversity of the bacterial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 69 (6): 1145–1155.

Shinzato N, Muramatsu M, Matsui T, Watanabe Y, 2007. Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 71 (4): 906–915.

Spiteller D, Dettner K, Boland W, 2000. Gut bacteria may be involved in interactions between plants, herbivores and their predators: microbial biosynthesis of N-acylglutamine surfactants as elicitors of plant volatiles. *Biol. Chem*., 381(8): 755–762.

Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M, 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*., 6(12): e1000002.

Wang AL, Yao ZC, Zheng WW, Zhang HY, 2014. Bacterial communities in the gut and reproductive organs of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) based on 454 pyrosequencing. *PLoS ONE*, 9(9): e106988.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol*., 73(16): 5261–5267.

Wang Z, Xu Q, Yuan M, Zhang L, Gao M, Sun JG, 2015. Isolation and functional characterizations of spinach endogenous nitrogen-fixing bacteria. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, (5): 116–121. [王泽, 徐齐, 袁梅, 张磊, 高淼, 孙建光, 2015. 菠菜内生固氮菌的分离及其功能特性研究. 中国土壤与肥料, (5): 116–121]

Wang ZJ, 2014. Molecule Identification and Analyse of the Symbiont Microorganism in Mealybug (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley). MSc Thesis, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang. [王震杰, 2014. 扶桑绵粉蚧共生微生物的分子鉴定及分析. 浙江金华: 浙江师范大学硕士学位论文]

Wong ACN, Chaston JM, Douglas AE, 2013. The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *ISME J*., 7(10): 1922–1932.

Xia XF, 2014. Organizational Diversity and Functional Characterization of Microbiota in the Midgut of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). PhD Dissertation, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 福州: 福建农林大学博士学位论文]

Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693. [相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 687–693]

Xiang H, Li MW, Zhao Y, Zhao LP, Zhang YH, Huang YP, 2007. Bacterial community in midguts of the silkworm larvae estimated by PCR/DGGE and 16S rDNA gene library analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 50(3): 222–233. [相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平, 2007. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. 昆虫学报, 50(3): 222–233]

Xiang H, Wei GF, Jia SH, Huang JH, Miao XX, Zhou ZH, Zhao LP, Huang YP, 2006. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can. J. Microbiol*., 52(11): 1085–1092.

Yan QS, Yang J, Li HM, Cao AC, Chen QH, Wen YQ, He L, 2006. Advances in the studies on the chemical components and bioactivity of *Eupatorium adenophorum* Spreng as a intruding species. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 42(1): 70–73. [闫乾胜, 杨婕, 李华民, 曹坳程, 陈庆华, 文永奇, 何兰, 2006. 入侵物种紫茎泽兰化学成分及生物活性研究进展. 北京师范大学学报(自然科学版), 42(1): 70–73]

Ye ZF, Wang F, Wang ZY, 2013. Study on denitrification kinetics and bacterial community of nitrate-contaminated drinking water. *Space Medicine & Medical Engineering*, 26(3): 234–238. [叶正芳, 王凤, 王中友, 2013. 饮用水中硝酸盐的反硝化动力学及微生物群落研究. 航天医学与医学工程, 26(3): 234–238]

Yuan C, 2014. Studies on the Gut Microbiota of *Macrotermes barneyi*. MSc Thesis, Shandong University, Jinan. [员超, 2014. 黄翅大白蚁肠道微生物研究. 济南: 山东大学硕士学位论文]

Zerbino DR, Birney E, 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*., 18(5): 821–829.

Zhang XY, Zhang YJ, Qin QL, Xie BB, Chen XL, Zhou BC, Zhang YZ, 2012. Genome sequence of the protease-producing bacterium *Rheinheimera nanhaiensis* E407-8^T, isolated from deep-sea sediment of the South China Sea. *J. Bacteriol*., 194(24): 7001–7002.

Zhang YQ, 2013. The Study of the Symbiotic Bacteria in Honeybee Intestinal Tract. MSc Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [张义强, 2013. 蜜蜂肠道共生菌的研究. 福州: 福建农林大学硕士学位论文]

(责任编辑: 袁德成)